

*На правах рукописи*

*Мона Фарид*

МОНА АЛИ ФАРИД ИБРАХИМ САЛЯМА

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕВЕРТАНТОВ К ПРОТОТРОФНОСТИ ШТАММОВ  
БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ АМИНОКИСЛОТНОГО ГОЛОДАНИЯ

03.02.03 – микробиология; 03.02.07 –генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре генетики ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Барабанщиков Борис Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Шарипова Маргарита Рашидовна,

доктор биологических наук  
Хасанов Фуат Каримович

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии Наук  
Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова  
РАН (г.Москва)

Защита диссертации состоится «22» февраля 2012 года в 13 часов на заседании  
Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском)  
федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18,  
аудитория 211.  
Факс 8(843)238-76-01

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.  
Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по  
адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

Автореферат разослан « \_ » января 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Одним из удивительных свойств микроорганизмов является их быстрая приспособляемость к меняющимся условиям окружающей среды. Объяснение этого феномена привело некоторых исследователей к утверждению положения, что внешняя среда является ведущим фактором в возникновении подобных изменений. Сторонников подобной точки зрения не совсем корректно называют "ламаркистами". Они утверждают, что изменение внешней среды вызывает адекватный ответ в живых организмах, который позволяет им приспособиться к изменившимся условиям.

Классические эксперименты А. Вейсмана и В. Иогансена казалось бы окончательно опровергли подобную точку зрения. Мутации, как основной источник наследственной изменчивости, возникают вне зависимости от конкретных условий среды и не адекватны этим условиям. Взгляд на мутации как на случайные, ненаправленные изменения генотипа, не адекватные вызвавшими их условиям внешней среды, прочно укоренился в биологии, составляя основное содержание эволюционной концепции Ч.Дарвина. Однако данные последних лет указывают на то, что целый ряд мутаций у микроорганизмов возникает как адаптивный ответ на изменение окружающей среды. Такого рода мутации получили не совсем корректное название "адаптивных" или "направленных".

В известной степени возмутителем спокойствия явилась работа Кэрнса с сотрудниками (Cairns et al., 1988), в которой было показано, что мутантные клетки *E. coli*, не способные сбраживать лактозу, приобретают эту способность при помещении на среду, в которой единственным источником углерода оказывается сахар лактоза.

Наиболее интригующим моментом этих экспериментов явилось то, что мутации в бактериальных клетках могут возникать в отсутствии клеточных делений, т.е. в клетках, находящихся в гипометаболическом состоянии. Такое состояние достигается, когда клетки помещают в селективные условия, лишённые необходимых для роста компонентов, но не являющихся летальными для выживания. Позднее эти мутации стали называть мутациями в "неделящихся клетках", мутациями "в стационарной фазе роста" (Sung, Yasbin, 2002).

Объяснение обнаруженных фактов вызвало оживленную дискуссию, и были предприняты попытки предложить целый ряд гипотетических моделей данному феномену (Hall, 1988; Stahl, 1988; Davis, 1988; Mitler and Lenski, 1990). Тем не менее на сегодняшний день нерешенным остается вопрос о механизмах возникновения подобных мутаций, распространении данного явления среди различных организмов.

**Цель работы:** установление количественных закономерностей возникновения реверсий к прототрофности и молекулярной природы подобных реверсий в клетках бактерий, находящихся в условиях аминокислотного голодания.

**Основные задачи исследования:**

1. Установить молекулярную природу мутации *hisC* в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922 и определить методами биоинформатики влияние данной мутации на изменение вторичной структуры кодируемого фермента.
2. Дать количественную оценку частоты возникновения ревертантов к прототрофности в зависимости от условий культивирования бактерий.
3. Выявить роль генов, отвечающих за систему "строгого ответа" на частоту возникновения спонтанных ревертантов *His<sup>+</sup>* у *Salmonella typhimurium*.
4. Определить влияние уровня транскрипции генов на частоту возникновения реверсий к прототрофности в неделящихся клетках бактерий.

**Научная новизна.** В работе впервые охарактеризована молекулярная природа мутации *hisC*, находящаяся в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922 и показано, что она представляет собой транзицию С → Т в 208-м положении, что приводит к изменению смысла кодона CGG на TGG и замещению аргинина в 70-м положении белка гистидинол-фосфат аминотрансферазы на триптофан. Дана количественная характеристика частоты возникновения реверсий к прототрофности по трем изученным маркерам (*His<sup>+</sup>*, *Trp<sup>+</sup>*, *Leu<sup>+</sup>*) в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922 в активно делящейся популяции и в условиях длительного аминокислотного голодания. Частота реверсий к прототрофности возрастет с увеличением времени инкубации клеток в условиях аминокислотного голодания. Показано, что частота возникновения *His<sup>+</sup>* реверсий в клетках *Salmonella typhimurium* увеличивается при потере активности гена *groS*. Установлено, что частота возникновения реверсий *Leu<sup>+</sup>* зависит от уровня транскрипции генов лейцинового оперона *B. subtilis* в условиях аминокислотного голодания.

**Практическая значимость.** Полученные результаты вскрывают механизмы возникновения реверсий к прототрофности в зависимости от условий культивирования и позволяют расширить представления о различных путях возникновения спонтанных мутаций в клетках бактерий. Определена молекулярная природа и характер реверсий к прототрофности в зависимости от условий культивирования бактериальных клеток.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.** Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Казанского федерального университета. Автор участвовал в

планировании и проведении экспериментов по выбранной теме, обработке полученных результатов, анализе и интерпретации полученных данных, написании текста статей и обсуждении текста с рецензентами.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Мутация *hisC B. subtilis* SB-3922 представляет собой транзицию С → Т в 208 положении, что приводит к изменению смысла кодона CGG на TGG и замещению аргинина в 70-м положении белка гистидинол-фосфат аминотрансферазы на триптофан
2. Аминокислотное голодание увеличивает частоту встречаемости реверсий к прототрофности.
3. Большая часто реверсий к гистидиннезависимости обусловлена восстановлением смысла исходного кодона и связана с транзициями Т → С и трансверсиями Т → А в положении 208. Некоторые реверсии связаны с возникновением дополнительной супрессорной мутации.
4. Частота реверсий  $\text{Leu}^+$  возрастает с увеличением уровня транскрипции лейцинового оперона.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. «Международная конференция молодых ученых» (Минск, Апрель 2011г.).
2. «Современные проблемы генетики» (Казань, КФУ, октябрь 2011г.),
3. Ежегодных итоговых научных конференциях КФУ (2010, 2011).

**Публикации.** По данной теме опубликовано 2 работы в сборниках международных и всероссийских конференций, опубликованы 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Основное содержание работы изложено на 130 страницах машинописного текста, диссертация иллюстрирована 18 таблицами, 9 рисунком. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 140 публикаций, из которых 119 - зарубежных.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Список штаммов, использованных в работе, приведен в таблице 1.

Для выращивания культур *Bacillus subtilis* в качестве полноценной среды использовали питательный агар для культивирования микроорганизмов СПА (Силекс, Москва).

В качестве минимальной и селективной среды использовали среду Спицайзена (Spizizen, 1961).

Для выращивания клеток *Salmonella typhimurium* использовали среду (МПА). (Силекс, Москва). В качестве минимальной и селективной среды использовали среду Спицайзена с необходимыми добавками

Список штаммов *Bacillus subtilis* и *Salmonella typhimurium*

Штамм	Генотип	Источник
<i>B. subtilis</i> SB-3922	his C trp C leu B	Музей каф. генетики
<i>B. subtilis</i> KU-2	his C leu B	Данная работа
<i>B. subtilis</i> LCC26	trp C tnr A Em <sup>r</sup>	Beier et al., 2002
<i>B. subtilis</i> GP250	trp C nrg-lac Z Km <sup>r</sup>	Detsch, Stulke, 2003
<i>B. subtilis</i> FS-2	his C trp C leu B nrg-lacZ Km <sup>r</sup>	Данная работа
<i>B. subtilis</i> FS-3	his C trp C leu B nrg-lacZ Km <sup>r</sup> tnrA::Em <sup>r</sup>	Данная работа
<i>S. typhimurium</i> SF553	(RpoS+) /rpsL hisG	(Department of Microbiology & Immunology, University of South Alabama, USA)
<i>S. typhimurium</i> JF2794	(RpoS-) /rpsL hisG xyl rpoS <sup>LT2</sup> zgd-5178::Tn10(dTc)	

### Методы исследования

*Определение частоты возникновения реверсий.* Частоту реверсий к прототрофности в активно делящихся клетках бактерий определяли с помощью флуктуационного теста (Luria, Delbruck, 1943) и метода Ли и Коулсона (Lee, Coulson, 1946).

*Определение частоты встречаемости ревертантов к прототрофности в неделящихся клетках бактерий.* Выросшую в течение 21 часов культуру изучаемого штамма отмывали от питательной среды путем центрифугирования и ресуспендировали в жидкой среде Спицайзена, лишенной необходимых для роста клеток аминокислот. Содержимое разлили в 4 колбы по 20 мл в каждую. В три из них добавили по одной аминокислоте (гистидин, либо триптофан, либо лейцин), одну оставили без добавок в качестве контроля.

На 3, 4, 6 день культивирования при комнатной температуре из каждой колбы брали пробы по 0,1 мл и высевали на селективные среды для подсчета числа спонтанных ревертантов His<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup>, Trp<sup>+</sup>. Подсчет числа колоний ревертантов проводили на 3 сутки после выращивания при 37°C.

Частоту встречаемости спонтанных ревертантов к прототрофности определяли как отношение числа выросших колоний на селективной среде к общему числу жизнеспособных клеток.

*Выделение хромосомной ДНК.* Трансформирующую ДНК из клеток *B. subtilis* выделяли фенольным методом с некоторыми модификациями (Прозоров, 1988).

Хромосомную ДНК из бактериальных клеток для проведения ПЦР и последующего секвенирования выделяли с использованием набора GeneJET™ DNA Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Life Science, США) в соответствии с методикой, рекомендуемой производителем.

Концентрацию полученного препарата ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop.

*Генетическая трансформация клеток B. Subtilis.* Трансформацию клеток *B. subtilis* проводили по (Anagnostopoulous, Spizizen, 1961).

*ПЦР-амплификация фрагмента гена his. C* Амплификацию фрагмента гена *his C* проводили по стандартной методике (Sambrook, 2001). Праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия, Москва).

*Выделение ДНК из агарозного геля.* После электрофоретического разделения необходимые ПЦР-фрагменты были выделены из агарозного геля с использованием набора AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxyGen biosciences, США) в соответствии с методикой, рекомендуемой производителем. Элюция выделенной ДНК осуществлялась в 30 мкл буфера для элюции (Eluent).

*Определение нуклеотидной последовательности.* Парное выравнивание полученных последовательностей Реакцию секвенирования с ПЦР-продукта проводила фирма Синтол (Москва). Результаты секвенирования обрабатывались программным пакетом Lasergene 5.03 (DNA STAR, Inc., США). Программа SeqMap использовалась для анализа сиквенсных хроматограмм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика мутации *his C* штамма SB-3922 *B. subtilis*

Ген *his C B. subtilis* контролирует структуру фермента гистидинол-фосфат аминотрансферазы, который принимает участие в биосинтезе ароматических аминокислот. Гистидинол-фосфат аминотрансфераза катализирует перенос амино-группы от глутамата к имидазол ацетат-фосфату с образованием 2-оксиглутарата и гистидинол фосфата (Nester, Montoya, 1976, Weigent, Nester, 1976). Для дальнейшего изучения характера реверсий в этом гене, приводящих к восстановлению способности синтезировать гистидин, необходимо было выяснить молекулярную природу мутации *his C* в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922. Используя данные о нуклеотидной последовательности гена *his C B. subtilis* в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),

На рис. 1 выделен желтым кодон 70, в котором обнаружена точковая мутация. Характер этой мутации был определен на основании сравнения нуклеотидных последовательностей данного участка гена *his C*, представленных в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ, и определенной нами нуклеотидной последовательности данного гена у штамма SB-3922 *B. subtilis*.

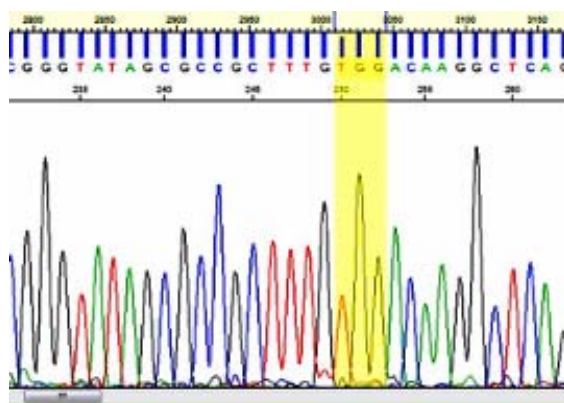


Рис. 1. Результаты сиквенса гена *his C* у штамма *B. subtilis* SB-3922  
Цветом выделена последовательность кодона 70.

Результаты такого сравнения, интересующего нас участка гена *his C*, приведены на рис. 2.



Рис. 2. Сравнение последовательностей аллели *his C*<sup>+</sup> (внизу) и мутантной аллели *hisC* у штамма *B. subtilis* SB-3922 (вверху)

Приведенные данные показывают, что в штамме SB-3922 мутация *his C* представляет собой транзицию  $C \rightarrow T$  в 208 нуклеотидной позиции, что соответствует изменению кодона CGG на TGG. Это приводит к замещению аминокислоты аргинин в белке дикого типа на триптофан в мутантной форме. Анализ нуклеотидной последовательности гена *his C* у других видов бактерий, содержащихся в базе данных GenBank/EMBL/DBJ с помощью множественного выравнивания, осуществленного программой BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), показал, что во всех известных случаях в 70-м положении гистидинол-фосфат аминотрансферазы находится аминокислота аргинин, что свидетельствует о высокой консервативности данного участка.

Влияние замены аргинина на триптофан в 70 положении белка гистидинол-фосфат аминотрансферазы исследовано с помощью различных методов предсказания 3D-структур белка.

В результате была получена модель наложения двух белковых структур в PDB-формате. Для визуализации сравниваемых моделей использовалась программа AutoDock 4.0.

Результаты проведенного сравнения представлены на рис. 3 и рис.4.



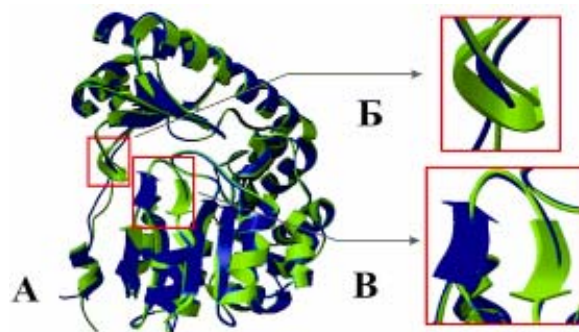


Рис. 3 . Наложение трехмерных моделей исходной и мутантной форм гистидинол-фосфат аминотрансферазы штамма *B. subtilis* SB-3922 Ракурс 1.

Синим цветом обозначен исходный белок, зеленым – мутантный. А – общий вид, Б, В – фрагменты структуры в 3-х кратном увеличении.

А. Общий вид модели

Б. Фрагмент модели, на котором видно, что замена повлияла на вторичную структуру участка 330 - 333 (GLY,ASN,ALA,ALA) и после замены представляет собой  $\alpha$ -спираль.

В. Фрагмент модели, со своеобразной инверсией, где  $\beta$ -слой оказывается "сдвинутым" на четыре аминокислотных остатка, в положение 138-140 (GLY,SER,HIS) вместо 134-136 (LEU,ARG,PRO).

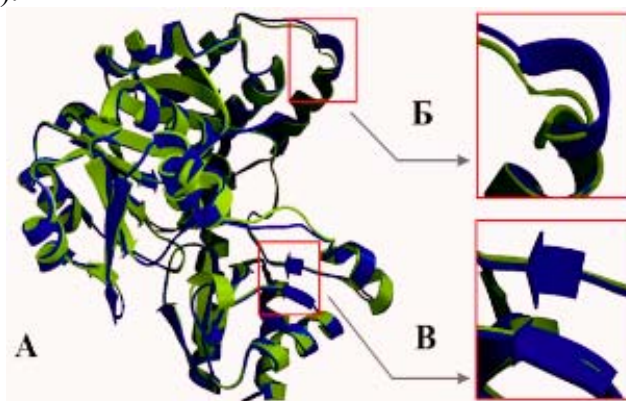


Рис. 4. Наложение трехмерных моделей исходной и мутантной форм гистидинол-фосфат аминотрансферазы штамма *B. subtilis* SB-3922 Ракурс 2.

Синим цветом обозначен исходный белок, зеленым – мутантный. А – общий вид, Б, В – фрагменты структуры в 3-х кратном увеличении.

А. Общий вид модели

Б. Фрагмент, показывающий, что мутантный белок потерял структуру  $\alpha$ -спирали на участке 55 – 58.

В. Фрагмент, иллюстрирующий потерю  $\beta$ -укладки на участках 32 – 34 и 325 – 327.

Таким образом нами обнаружено, что замена  $C \rightarrow T$  в 208 нуклеотидной позиции от начала гена приводит к частичному изменению вторичной структуры и снижению ферментативной активности гистидинол-фосфат аминотрансферазы, что проявляется в ауксотрофности мутантных клеток по гистидину.

Мутацию his C в штамме *B. subtilis* SB-3922 мы предлагаем обозначить как his C208. В литературе были описаны и другие мутантные аллели гена his C. В клетках штамма *B. subtilis* YB955 была обнаружена мутация his C952, которая

представляла собой транзицию С → Т в 952 положении (Huang-Mo Sung and Yasbin, 2002). Эта мутация приводила к изменению кодона САА (Gln) в нонсенс кодон ТАА (amber). В отличие от указанных авторов, имевших дело с нонсенс-мутацией, мы исследовали штамм, содержащий миссенс-мутацию.

### **Частота спонтанных реверсий к прототрофности в активно делящихся клетках бактерий**

Флуктуационный тест позволяет определить частоту мутаций в исследуемом гене в пересчете на одну клетку за одно поколение. Мутации, выявляемые этим тестом, происходят в активно делящихся бактериальных клетках. Возможный механизм возникновения таких мутаций связан, скорее всего, с ошибками в процессе репликации. Мы определили частоту возникновения спонтанных ревертантов His<sup>+</sup> и Trp<sup>+</sup> в клетках штаммов *B. subtilis* SB-3922, который, напомним, нес мутации одновременно в трех разных генах - *his C trp C leu B* и *B. subtilis* KU-2 – *his C leu B*.

В таблице 2 приведены частоты спонтанных реверсий.

Таблица 2

Частота спонтанных реверсий His<sup>+</sup> и Trp<sup>+</sup> в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922, выращенных на полноценной среде

Характер реверсий	Частота реверсий (x 10 <sup>-8</sup> )			
	Повторности			
	1	2	3	Среднее
His <sup>+</sup>	1,67	2.7	1,4	1,92
Trp <sup>+</sup>	1,2	3.1	1.5	1,93

В таблице 3 приведены результаты флуктуационного анализа штамма *B. subtilis* SB-3922 при выращивании клеток в синтетической среде Спидайзена.

Таблица 3

Частота спонтанных реверсий His<sup>+</sup> и Trp<sup>+</sup> в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922, выращенных на синтетической среде Спидайзена

Характер реверсий	Частота реверсий (x 10 <sup>-8</sup> )			
	Повторности			
	1	2	3	Среднее
His <sup>+</sup>	1,09	1.64	1,8	1,51
Trp <sup>+</sup>	1,09	1.64	2,1	1,61

Наиболее наглядное различие в характере появления реверсий к прототрофности в зависимости от разных условий культивирования клеток

(полноценная среда МПБ и среда Спицайзена) дает сравнительный анализ среднего числа колоний и их дисперсии. Результаты такого сравнения приведены в таблице 4.

Таблица 4

Среднее число колоний ревертантов и дисперсия их числа  
штамма *B. subtilis* SB-3922 при выращивании в разных условиях

Параметр	Полноценная среда		Синтетическая среда	
	His <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>	His <sup>+</sup>	Trp <sup>+</sup>
Среднее число колоний	9.72	8.27	0.72	1.05
Дисперсия	190.33	268.68	0.91	1.82

Таким образом, показано, что частота и характер возникновения реверсий к прототрофности в активно делящихся клетках зависит от условий культивирования. При росте клеток на полноценной питательной среде основным механизмом возникновения мутаций являются ошибки, допускаемые ДНК-полимеразой, спонтанно возникающие модификации азотистых оснований, нарушения процесса гомологичной рекомбинации. Эти ошибки не успевают полностью устраниться системой репарации неправильно спаренных оснований (mismatch repair MMR). В ряде работ было продемонстрировано, что система MMR влияет на частоту возникающих мутаций (Marti et al., 2002; Harfe and Jinks-Robertson; 2000; Yang, 2000). В условиях ограничения источников питания, которые обнаруживаются при росте на синтетической среде, система удаления неправильно спаренных оснований успевает справиться с этими ошибками к очередному раунду репликации. Таким образом, различия в характере возникновения реверсий к прототрофности можно объяснить различиями в физиологических процессах бактериальных клеток, растущих в разных условиях.

Помимо установления характера возникновения реверсий к прототрофности, нас интересовали молекулярные изменения в структуре гена, возникающие у ревертантов. С этой целью нами более подробно были проанализированы His<sup>+</sup>-ревертанты. Для этого из клеток 10 независимо возникших ревертантов была выделена хромосомная ДНК и с помощью специфических праймеров к гену *hisC* проведена амплификация данного гена. Хроматограмма полученных продуктов в реакции ПЦР, приведенная на рис.5.показывает, что во всех случаях нам удалось получить полноразмерные копии гена *hisC*.

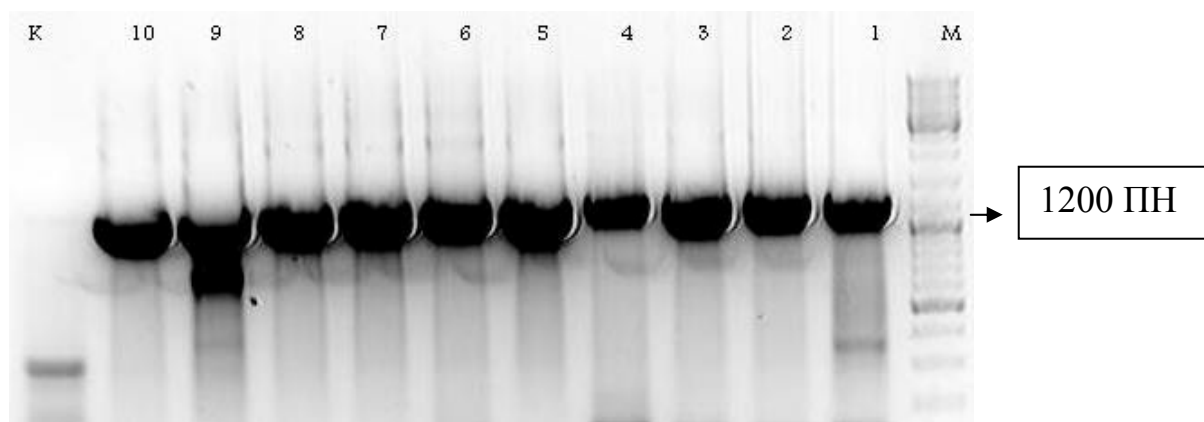


Рис. 5. Хроматограмма продуктов ПЦР гена *hisC208 B. subtilis*. Размер полученных продуктов составляет 1200 нуклеотидных пар, что соответствует размеру данного гена. Это позволило в дальнейшем провести секвенирование данного участка и сравнить нуклеотидную последовательность гена *his C* у ревертантов и исходного штамма *B. subtilis SB-3922*. В таблице 5 приведены результаты такого анализа

Таблица 5

Характеристика реверсий  $\text{His}^+$ , возникающих в активно делящихся клетках штамма *B. subtilis SB-3922*

Число клонов	Позиция мутации	Тип мутации	Изменения в ДНК	Результат мутации
4	208	транзиция $\text{T} \rightarrow \text{C}$	$\text{TGG} \rightarrow \text{CGG}$	$\text{Trp} \rightarrow \text{Arg}$
6	208	трансверсия $\text{T} \rightarrow \text{A}$	$\text{TGG} \rightarrow \text{AGG}$	$\text{Trp} \rightarrow \text{Arg}$

Во всех проанализированных случаях реверсия к прототрофности по гистидину была связана с восстановлением нативной структуры белка и замещением аминокислоты триптофана на исходную аминокислоту аргинин в 70-м положении. Однако молекулярная природа реверсий оказалась различной. Приблизительно в половине проанализированных клонов ревертантов произошла истинно обратная мутация. Исходная мутация *hisC* в штамме *B. subtilis SB-3922* – транзиция  $\text{C} \rightarrow \text{T}$  в 208-м положении – заменяется на транзицию  $\text{T} \rightarrow \text{C}$  в клетках ревертантов, что приводит и восстановлению исходного смысла кодона  $\text{CGG}$ , кодирующего включение аминокислоты  $\text{Arg}$  в 70-м положении. В других случаях восстановление исходной структуры мутантного белка, т.е. замещение триптофана на аргинин, произошло за счет трансверсии  $\text{T} \rightarrow \text{A}$ . В этом случае кодон  $\text{TGG}$  ( $\text{Trp}$ ) превратился в кодон  $\text{AGG}$ , который также кодирует включение аргинина в 70-м положении фермента гистидинол-фосфат аминотрансферазы.

Анализ реверсий к прототрофности в активно делящихся клетках штамма *B. subtilis SB-3922* позволил установить, что при их росте на полноценной

питательной среде ревертанты преимущественно возникают в момент роста до попадания клеток в селективные условия, а сама реверсия связана с восстановлением исходного смысла кодона. Когда же клетки выращивают на синтетической питательной среде Спицайзена, содержащей все необходимые для роста аминокислоты, реверсии к прототрофности возникают преимущественно на селективной среде, т.е. после попадания клеток в условия аминокислотного голодания. Тем не менее, молекулярная природа реверсий His<sup>+</sup> оказывается одинаковой в обоих случаях и связана с замещением аминокислоты триптофана в мутантном белке на аргинин в клетках ревертантов His<sup>+</sup>.

### **Частота встречаемости ревертантов в голодающих культурах**

Одной из основных задач нашей работы являлась количественная оценка частоты возникновения реверсий к прототрофности в условиях аминокислотного голодания бактериальной культуры. Клетки штамма *B. subtilis* SB-3922 выращивали до поздней стационарной фазы на разных питательных средах – полноценной (МПБ) и синтетической (среда Спицайзена) в одинаковых объемах и одинаковой исходной плотности клеток. Затем клетки отмывали от питательной среды путем центрифугирования, суспендировали до исходного объема в минимальной среде Спицайзена без добавления аминокислот. В стерильные пробирки разливали по 2 мл исходной суспензии и инкубировали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени определяли число КОЕ и количество ревертантов His<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup>. Клетки, помещенные в условия аминокислотного голодания, не способны к дальнейшему делению, и со временем число КОЕ снижается. Динамика отмирания клеток и уменьшения числа КОЕ приведена в таблице 6.

Таблица 6

Изменение числа КОЕ ( $\times 10^7$ ) от продолжительности  
аминокислотного голодания клеток штамма *B. subtilis* SB-3922

Условия выращивания исходных клеток	Продолжительность инкубации в условиях голодания					
	0 дней	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	7 дней
Среда Спицайзена	6.0	3.35	0.61	0.19	0.05	0.009
Среда МПБ	62.5	34.0	10.4	3.59	0.30	0.06

Приведенные данные показывают, что исходное число жизнеспособных клеток отличается примерно в 10 раз в зависимости от условий выращивания. Нет ничего удивительного, что число образовавшихся клеток при выращивании на полноценной питательной среде оказывается больше, чем при росте тех же клеток на среде Спицайзена за одинаковый период инкубации при 37°C. Для

большей наглядности различий в выживаемости полученных разных способом исходных суспензий клеток эти же результаты приведены на рис. 6.

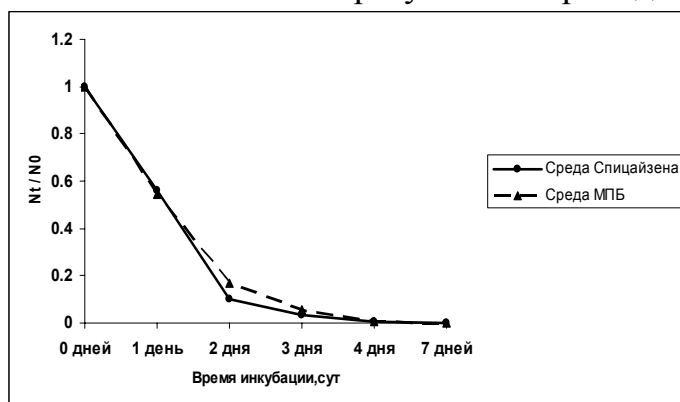


Рис. 6. Динамика отмирания клеток в условиях аминокислотного голодания оказалась сходной, и на протяжении всего периода наблюдений сохранялось различие примерно в 10 раз по числу КОЕ.

Данные, которые приведены в таблицах 7 и 8 показывают, что частота встречаемости ревертантов также отличалась. Только этот показатель оказался примерно в 10 раз выше для популяции клеток, которые выращивали на среде Спицайзена

Таблица 7

Частота встречаемости ревертантов His<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> (x 10<sup>6</sup> КОЕ<sup>-1</sup>) в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922, выращенных на среде Спицайзена, в зависимости от продолжительности инкубации в условиях голодания

Ревертанты	Продолжительность инкубации в условиях голодания					
	0 дней	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	7 дней
His <sup>+</sup>	0,066 ± 0,005	0,468 ± 0,014	1,52 ± 0,059	4,94 ± 0,339	13,4 ± 0,875	31,5 ± 0,85
Leu <sup>+</sup>	0,093 ± 0,007	0,398 ± 0,011	1,25 ± 0,045	5,11 ± 0,323	11,2 ± 0,536	45,3 ± 1,465

Таблица 8

Частота встречаемости ревертантов His<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> (x 10<sup>7</sup> КОЕ<sup>-1</sup>) в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922, выращенных на среде МПБ, в зависимости от продолжительности инкубации в условиях голодания

Ревертанты	Продолжительность инкубации в условиях голодания					
	0 дней	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	7 дней
His <sup>+</sup>	0,057 ± 0,002	0,336 ± 0,01	1,72 ± 0,12	4,88 ± 0,38	13,8 ± 0,19	48,9 ± 2,79
Leu <sup>+</sup>	0,063 ± 0,001	0,307 ± 0,006	1,79 ± 0,14	5,51 ± 0,46	12,6 ± 0,32	34,9 ± 0,35

На рис. 7. эти различия представлены в виде графика.

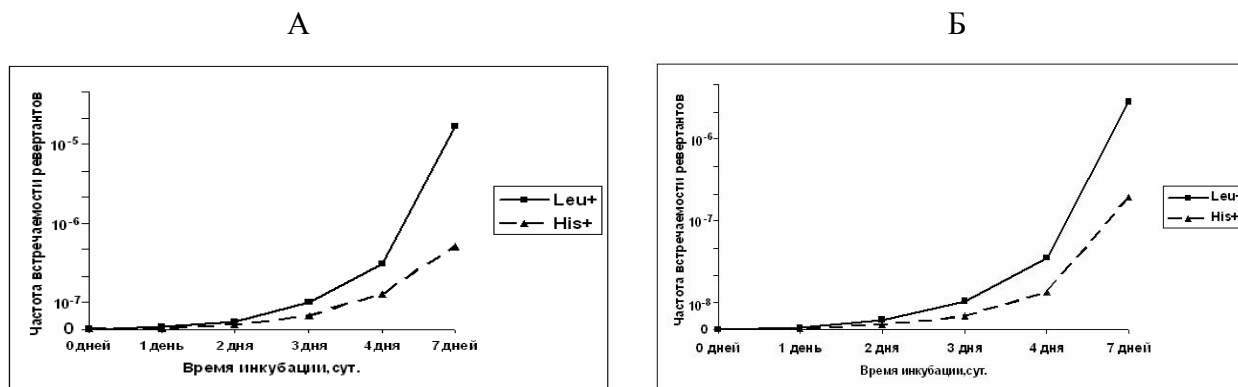


Рис. 7. Изменение частоты встречаемости ревертантов к прототрофности в клетках штамма *B. subtilis* SB-3922 в зависимости от условий культивирования.

А. Клетки выращивали на среде Спицайзена.

Б. Клетки выращивали на среде МПБ.

Уже в исходной популяции клеток, выращенных на среде Спицайзена, частота встречаемости ревертантов к прототрофности была примерно в 10 раз выше, по сравнению с клетками, которые были выращены на МПБ. В дальнейшем в обоих случаях частота встречаемости ревертантов повышалась в зависимости от продолжительности голодания культуры. Наибольшего значения частота встречаемости ревертантов оказывалась на 7 сутки выдерживания клеток в условиях аминокислотного голодания.

В дальнейшем мы решили выяснить, как влияет состав селективной среды на частоту возникновения His<sup>+</sup>. С этой целью мы выращивали клетки штамма *B. subtilis* KU-2 (his C leu B) до стационарной фазы роста на среде Спицайзена и высевали клетки на две селективные среды для выявления His<sup>+</sup> ревертантов. Одна из них содержала только лейцин, а другая – помимо лейцина дополнительно триптофан. Как показывают данные, приведенные в табл. 9, добавление триптофана в селективную среду приводило к увеличению числа образующихся ревертантов His<sup>+</sup>.

Таблица 9

Частота встречаемости His<sup>+</sup> ревертантов штамма *B. subtilis* KU-2 в зависимости от состава селективной среды (x 10<sup>7</sup> КОЕ<sup>-1</sup>)

Состав селективной среды	Характер роста ревертантов His <sup>+</sup>	
	Крупные колонии	Мелкие колонии
Лейцин	0,536	14,107
Лейцин + триптофан	1,785	83,053

Полученные данные показывают, что на селективной среде с дополнительно добавленным триптофаном частота встречаемости обоих классов ревертантов возрастала в 3-6 раз.

Исходя из изложенного мы предполагаем, что разница в частоте возникновения His<sup>+</sup> ревертантов в зависимости от состава селективной среды может быть связана с разным уровнем транскрипции гена *his C*. О наличии связи между частотой реверсий и уровнем транскрипции соответствующего гена свидетельствуют некоторые данные, полученные в последнее время (Pybus et al., 2010).

### **Влияние уровня транскрипции на частоту возникновения ревертантов в голодающих клетках бактерий**

Относительно недавно было показано, что на частоту возникновения Leu<sup>+</sup> ревертантов влияет уровень транскрипции лейцинового оперона. В данной работе авторы сконструировали плизмиду, содержащую мутантную аллель гена *leu C427* под контролем конститутивного *Hyperspank*-промотора (Pybus et al., 2010). Мы решили проверить, изменится ли частота реверсий Leu<sup>+</sup> в зависимости от уровня транскрипции лейцинового оперона при физиологических условиях.

Регулировать уровень транскрипции лейцинового оперона в клетках бацилл можно путем варьирования доступности источников азота. Лейциновый оперон в клетках *B.subtilis* находится под контролем факторов транскрипции TnrA и CodY (Yoshida et al., 2003, Molle et al., 2003). При этом TnrA активирует транскрипцию в условиях недостатка азота, а CodY подавляет при его избытке. Для контроля активности фактора TnrA и косвенной оценки уровня транскрипции TnrA-зависимых генов, штамм *B.subtilis* SB-3922 трансформировали геномной ДНК *B.subtilis* GP250, несущей ген β-галактозидазы под контролем TnrA-зависимого *nrg*-промотора (Detsch and Stulke, 2003) с получением штамма *B.subtilis* FS-2.

При росте штамма *B.subtilis* FS-2 на среде SMM с 20 мМ нитрата калия в качестве источника азота, уровень активности β-галактозидазы в клетках был в 5 раз выше по сравнению со средой, содержащей 20 мМ хлорида аммония, что свидетельствовало об изменении уровня активности фактора TnrA, а следовательно и транскрипции лейцинового оперона. Эти результаты приведены в таблице 10. При этом частота возникновения Leu<sup>+</sup> ревертантов прямо зависела от уровня транскрипции, снижаясь в 2 раза на среде с хлоридом аммония.

На среде, содержащей валин и глутамин в концентрациях по 0.2%, активности β-галактозидазы не обнаруживалось, что свидетельствовало об отсутствии транскрипции TnrA-зависимых генов.

Известно, что присутствие валина приводит также к репрессии CodY-регулируемых промоторов (Molle et al., 2003).



Таблица 10

Зависимость частоты возникновения  $\text{Leu}^+$  ревертантов штамма *B. subtilis* FS-2 от уровня транскрипции лейцинового оперона

	Источник азота в среде культивирования		
	20 мМ $\text{KNO}_3$	20 мМ $\text{NH}_4\text{Cl}$	0.2% валин 0.2% глутамин
Частота возникновения $\text{Leu}^+$ ревертантов ( $\times 10^6 \text{ КОЕ}^{-1}$ )	4.67 $\pm$ 1.33	3.07 $\pm$ 0.53	1.87 $\pm$ 0.53
Активность $\beta$ -галактозидазы, ед/мг белка	8.3	1.7	0

Известно, что присутствие валина приводит к репрессии CodY-регулируемых промоторов (Molle et al., 2003). В этих условиях частота появления  $\text{Leu}^+$  ревертантов оказывалась наименьшей по сравнению с условиями ограничения по азоту и высокого уровня транскрипции CodY и TnrA зависимых генов. Полученные результаты свидетельствуют о прямой зависимости скорости реверсий к прототрофности в гене *leuB* от уровня его транскрипции.

Чтобы подтвердить это предположение, штамм *B. subtilis* FS-2 трансформировали геномной ДНК штамма *B. subtilis* LCC26 ( $\Delta\text{tnrA}$ ,  $\text{Em}^r$ ), несущей нокаут-мутацию гена *tnrA* и ген устойчивости к эритромицину в качестве маркера, с получением штамма *B. subtilis* FS-3. На среде, содержащей 2 мМ хлорида аммония (ограничение по азоту), количество  $\text{Leu}^+$  ревертантов штамма *B. subtilis* FS-3 было в 2 раза меньше, чем в случае штамма *B. subtilis* FS-2 с функционально активным фактором транскрипции (таблица 11).

Таблица 11

Частота возникновения  $\text{Leu}^+$  ревертантов в клетках штаммов *B. subtilis* FS-2 и *B. subtilis* FS-3 в условиях ограничения по источнику азота

	<i>B. subtilis</i> FS-3	<i>B. subtilis</i> FS-2
Частота возникновения $\text{Leu}^+$ ревертантов ( $\times 10^6 \text{ КОЕ}^{-1}$ )	1.44 $\pm$ 0.16	3.07 $\pm$ 0.92
Активность $\beta$ -галактозидазы, ед/мг белка	0	1.8

Результаты, представленные в таблице 12, показывают, что внесение глутамин и валина в качестве источников азота еще в 2 раза снижало частоту образования  $\text{Leu}^+$  ревертантов в клетках штамма *B. subtilis* FS-2. По-видимому,

это связано с подавлением в этих условиях транскрипции лейцинового оперона также со стороны белка CodY.

Таблица 12

Частота возникновения Leu<sup>+</sup> ревертантов штамма *B. subtilis* FS-3  
в условиях различной доступности источника азота

	Источник азота в среде культивирования			
	20 mM NH <sub>4</sub> Cl	0.02% глутамин	0.2% глутамин	0.2% валин 0.2% глутамин
Частота возникновения Leu <sup>+</sup> ревертантов (×10 <sup>6</sup> КОЕ <sup>-1</sup> )	1.44±0.16	0.68±0.11	0.52±0.06	0.62±0.03

Полученные данные подтверждают ранее известный результат о зависимости частоты возникновения Leu<sup>+</sup> ревертантов от уровня транскрипции лейцинового оперона в клетках бацилл (Pybus et al., 2010). Однако в отличие от указанных авторов, которые продемонстрировали данную зависимость на искусственно полученной генетической конструкции лейцинового оперона под контролем промотора лактозного оперона, нам удалось показать, что и в естественных условиях регуляции транскрипции лейцинового оперона обнаруживается та же закономерность – с увеличением уровня транскрипции лейцинового оперона частота реверсий Leu<sup>+</sup> возрастает.

Таким образом, уровень адаптивного мутагенеза в клетках бацилл может зависеть от интенсивности транскрипции соответствующего гена. Интересно заметить, что этот механизм справедлив для клеток, находящихся в стационарной фазе роста, а именно ограниченных некоторыми факторами окружающей среды, в том числе голоданием, стрессом. Следовательно, наибольшее количество мутаций накапливается в генах, продукты которых призваны преодолеть неблагоприятное воздействие путем активной их транскрипции.

### **Влияние системы "строгого ответа" на частоту возникновения спонтанных ревертантов**

Существует несколько специфических систем, которые запускаются в ответ на определенные типы стресса, регулируют транскрипцию соответствующих генов в ответ на изменение окружающих условий (Ishihama, 2000). Кроме этого у бактерий имеется система общего стресс ответа, которая находится под контролем белка RpoS. RpoS индуцируется во время перехода от экспоненциальной фазы роста к стационарной фазе или в ответ на различные условия, вызывающие стресс у бактерий. Это сопровождается активацией RpoS-регулируемых генов стресс-ответа и формированию ряда физиологических и

морфологических изменений (Hengge-Aronis, 2002; . Lange and Hengge-Aronis, 1991).

Среди различных типов стресс-ответов бактерий наименее изученным является феномен адаптивного мутагенеза. Было установлено, что адаптивный мутагенез у *Salmonella typhimurium* запускается в ответ на воздействие различных неблагоприятных факторов среды (Бабынин и др., 2009; Бабынин, 2006; Гизатуллин и Бабынин, 1996). Эти данные свидетельствуют о возможности существования единой системы запуска индуцированного стрессом мутагенеза.

В этой связи мы попытались установить роль гена *rpoS* *Salmonella typhimurium* в адаптивном мутагенезе. Для этого мы определяли частоту возникновения адаптивных His<sup>+</sup> реверсий, а также мутаций устойчивости к канамицину и рифампицину у штаммов *Salmonella typhimurium* SF553 и JF2794 различающихся по *rpoS*-статусу.

Флуктуационный тест был применен нами для исследования характера возникновения His<sup>+</sup> ревертантов *Salmonella typhimurium*, а также мутантов, устойчивых к рифампицину и канамицину.

Адаптивный характер возникновения His<sup>+</sup> ревертантов был установлен для обоих штаммов SF553 и JF2794. Таким образом, мутация в гене *rpoS* у штамма JF2794 не влияла на характер возникновения адаптивных мутаций. Однако частота возникновения His<sup>+</sup> ревертантов у штамма SF553 была выше в 10 раз (табл. 13 ).

Таблица 13

Частота возникновения His<sup>+</sup> реверсий у штаммов SF553 и JF2794

Повторности	SF553 (rpoS+)	JF2794 (rpoS)
1	$2,1 \times 10^{-10}$	$1,01 \times 10^{-10}$
2	$8,47 \times 10^{-9}$	$1,02 \times 10^{-9}$
3	$4,77 \times 10^{-9}$	$0,27 \times 10^{-9}$
4	$0,57 \times 10^{-9}$	$0,41 \times 10^{-9}$
Среднее	$3,5 \times 10^{-9}$	$0,45 \times 10^{-9}$

Ранее было показано, что RpoS важен для адаптивных точковых мутаций и амплификации в стационарной фазе у *E. coli* (Bjedov et al., 2003; Lombardo et al., 2004).

Различие в частоте мутаций у штаммов SF553 и JF2794 могут быть результатом как прямого участия *rpoS* в мутагенезе, так и косвенного, влияя на

общую устойчивость бактерий к негативному воздействию внешних факторов. Мутанты по гену *rpoS* у *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* показывают быструю потерю жизнеспособности в течение длительного голодания. Они также высокочувствительны к множеству стрессовых факторов, включая ультрафиолетовое облучение, повышенную температуру, высокую осмотическую концентрацию, низкую pH, и перекись водорода (Hengge-Aronis, 2002).

Для условий аминокислотного голодания различие в чувствительности клеток к данному типу стресса мы определяли по динамике отмирания клеток в условиях голодания по гистидину. Результаты опытов представлены на рис 8.

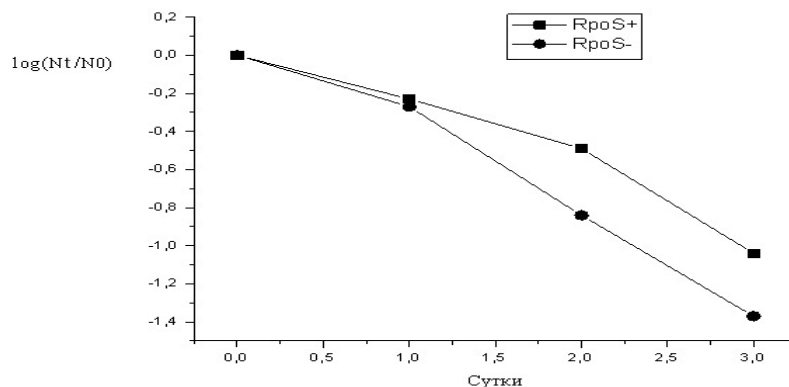


Рис.8. Динамика отмирания клеток штаммов SF553(RpoS<sup>+</sup>) и JF2794 (RpoS<sup>-</sup>) в условиях аминокислотного голодания.

Действительно скорость отмирания штамма JF2794 была выше. Однако разница со штаммом SF553 в первые двое суток была не более чем на 30%, в то время как по частоте они различались более чем в два раза. Ранее было показано, что 90% адаптивных His<sup>+</sup> ревертантов возникает на первые двое суток голодания. Таким образом, мы можем заключить, что ген *rpoS* напрямую участвует в адаптивном мутагенезе.

В настоящий момент является установленным фактом участие в адаптивном мутагенезе SOS-индуцибельных полимераз (Lombardo et al., 2004; Gizatullin and Babynin, 1996). Индукция всех трех типов SOS-индуцибельных полимераз была отмечена в условиях голодания, а также в стационарной фазе роста бактериальной культуры (Yeiser et al., 2002). В работе Лайот и Фостер (Layton and Foster, 2003) показано, что одна из SOS-индуцибельных полимераз Pol IV индуцируется в стационарной фазе, и эта индукция требует RpoS белка. Если RpoS является активным, уровень Pol IV остается высокими в течение 3 дней, именно в этот период происходит возникновения большей части всех адаптивных мутаций (Гизатуллин и Бабынин, 1996). Мы считаем, что для установления механизма участия *rpoS* в адаптивном мутагенезе, требуется выяснить влияние *rpoS* на активацию SOS-индуцибельных полимераз.

Таким образом, можно заключить, что белок RpoS принимает

участие в адаптивном мутагенезе у *Salmonella typhimurium*, повышая частоту спонтанных His<sup>+</sup> реверсий в среднем в 10 раз.

## Выводы

1. Установлена молекулярная природа мутации his C в клетках штамма *Bacillus subtilis* SB-3922. Мутация his C представляет собой транзицию C → T в 208 нуклеотидной позиции, что соответствует изменению кодона CGG на TGG и приводит к замещению аргинина в 70-м положении гистидинол-фосфат аминотрансферазы на триптофан.

2. Определена частота возникновения реверсий His<sup>+</sup> и Trp<sup>+</sup> в активно делящейся популяции клеток при росте на полноценной питательной среде. Она оказалась одинаковой для этих маркеров и составляла  $1,9 \times 10^{-8}$ . Реверсии His<sup>+</sup> обусловлены транзициями T → C или трансверсиями T → A в 208 положении, что приводило к превращению мутантного кодона TGG в кодон CGG, либо AGG и восстановлению нативной структуры гистидинол-фосфат аминотрансферазы.

3. Показано, что частота встречаемости ревертантов His<sup>+</sup> и Leu<sup>+</sup> в условиях длительного аминокислотного голодания возрастала с увеличением продолжительности инкубации и на 7 день составляла в среднем  $4 \times 10^5$  КОЕ<sup>-1</sup>.

4. Установлено, что в клетках *Salmonella typhimurium*, несущих мутацию в гене *rpoS*, частота встречаемости His<sup>+</sup> ревертантов снижалась в 10 раз по сравнению с клетками *rpoS*<sup>+</sup>.

5. Показано, что частота возникновения ревертантов Leu<sup>+</sup> в клетках *Bacillus subtilis*, находящихся в стационарной фазе роста, возрастает с увеличением уровня транскрипции лейцинового оперона.

## Публикации по теме диссертации

1. Саляма, М.А.Ф. Роль гена *rpoS* в адаптивном мутагенезе у *Salmonella typhimurium*/ М.А.Ф.Саляма, Р.М.Гимадеева, Э.В.Бабынин, Б.И.Барабанчиков. // Учён. Зап. Казан. Ун-та. Сер. Естеств. науки.- 2011.- Т.153, кн. 2.- С.22-28.
2. Babynin, E.V. Adaptive mutagenesis is a part of the general respons to stress in *Salmonella typhimurium* / E.V.Babynin, R.M.Gimadeeva, **Mona Salama**, B.I. Barabanchikov //Advances in Biological Reserch.-2011.-V.5,№.5.-P.233-236.
3. Саляма, М.А.Ф. (Фарид Саляма М.А.). Адаптивный мутагенез является частью общего ответа на стресс у бактерий / М.А. Фарид Саляма, Р.М Гимадеева, Э.В. Бабынин Э.В., Б.И. Барабанчиков.// Международная конференция молодых ученых «молодежь в науке»- Минск.- 25–29 Апреля 2011.
4. Саляма, М.А.Ф. (Фарид Саляма М.А.). Уровень транскрипции определяет частоту адаптивного мутагенезе в клетках *Bacillus subtilis* / М.А. Фарид Саляма,

А.Р.Каюмов, К.П. Федорова / Сборник Материалов научной конференции посвященной 35-летию кафедры генетики « Современные проблемы генетикт »- Казань.-7-9 октября 2011.-Казань, 2011 .-С.-46-47

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н. проф. **Барабанщикову Б.И.** за внимательное отношение к работе, за чёткое руководство, передачу научного опыта и помощь в выполнении работы, возможность с удовольствием решать поставленные задачи; д.б.н., доц. **Ризванову А.А.** за помощь при приведении молекулярной части исследований; к.б.н., доц. **Малкову С.В.** за помощь при приведении микробиологической части исследований; к.б.н., доц. **Бабынину Э.В.** за помощь и советы в процессе выполнения диссертационной работы; к.б.н., асс. **Каюмову А.Р.** за консультации в процессе выполнения работы; к.т.н., доц. **Фроловой Л.Л.** за помощь в проведении биоинформационного анализа; к.б.н., доц. **Гимадутдинову О.А.** и к.б.н., доц. **Хамидуллиной Р.Г** за помощь и советы в процессе выполнения работы; аспиранту кафедры генетики **Фирсовой С.С.** за помощь в проведении биоинформационного анализа и за помощь в работе над диссертацией. Автор выражает глубокую благодарность любимым сестрам – **Нахла,Нахед,Нихад** и **Манал** за консультации и поощрение в процессе выполнения работы. Особые слова благодарности **моей семье** за понимание, любовь и поддержку в работе. Автор искренне благодарен и признателен супругу **Ашраф Бадир** за безграничное терпение , понимание , помощь ,советы в процессе выполнения работы и за то, что он есть.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне. Факс 8(843)238-76-01